EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG VON GESTAGEN– UND ANDROGENDERIVATEN AUF KARZINOMZELLEN IN DER GEWEBEKULTUR

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Hans-Bernd Strubel

Saarbrücken

1974

Aus der Frauenklinik der Universität des Saarlandes
Homburg/Saar
Direktor: Professor Dr. med. H. Limburg

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG VON GESTAGEN- UND ANDROGENDERIVATEN AUF KARZINOMZELLEN IN DER GEWEBEKULTUR

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1974

vorgelegt von
Hans-Bernd Strubel
geb. am 19.8.1948 in Haßloch/Pfalz

Dekan: Professor Dr. med. G. A. JUTZLER

Referenten: Professor Dr. med. W. RINDT
Professor Dr. med. G. WERNER

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mündliche Prüfung: 3. Dezember 1974

MEINEN ELTERN

IN DANKBARKEIT GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	Einleitung.....	3
II.	Themastellung.....	17
III.	Material und Methode.....	19
IV.	Ergebnisse.....	27
V.	Diskussion.....	38
VI.	Zusammenfassung.....	45
VII.	Literaturverzeichnis.....	47

I. EINLEITUNG

In der Krebstherapie stehen heute drei Behandlungsmethoden sowie deren sinnvolle Kombination zur Verfügung:

- Operation,
- Strahlenbehandlung,
- Chemotherapie.

Während nach dem heutigen Stand unseres Wissens eine endgültige Krebsheilung nur durch die Radikaloperation oder die Strahlenbehandlung oder die Kombination beider Maßnahmen möglich scheint, wird die Chemotherapie häufig nur zusätzlich zur Rezidivprophylaxe oder palliativ angewendet (1), wenn auch vereinzelt über erfolgreiche Behandlungen des Chorionepithelioms mit Methotrexat und des Penis-Carcinoms mit Bleomycin berichtet wurde.

Trotzdem ist die Chemotherapie zu einer der drei Hauptwaffen gegen den Krebs geworden, besonders hinsichtlich erstaunenswerter Remissionen und Lebensverlängerungen.

Operation und Strahlenbehandlung stellen für den Organismus sehr schwerwiegende Eingriffe dar. Beide Methoden sind außerdem dann an ihren Grenzen angelangt, wenn aus dem lokalisierten Leiden durch Metastasierung ein Allgemeinleiden geworden ist, d.h. wenn sich ein maligner Tumor durch Metastasierung der Operation durch Strahlenbehandlung entzogen hat (1,24). Hier beginnt das große Gebiet der Chemotherapie, deren Ziel es ist, nicht nur lokal und regional am Ort des Primärtumors,

sondern auch an anderen Stellen des Organismus das Krebswachstum zu hemmen und unter Umständen die Operation und Strahlenbehandlung wirksam zu ergänzen.

Die Erfolge der Chemotherapie bakterieller Erkrankungen sind bei der Bekämpfung des Krebses bis heute ausgeblieben. Während die Mikroorganismen mit Ihrem eigenen Protoplasma, selbstständigen Stoffwechsel und besonders gestalteter Membranen sich ganz erheblich von Säugetierzellen unterscheiden, sind diese Abweichungen zwischen einer Tumorzelle und einer normalen Körperzelle nur sehr gering. Wir sind bis heute noch nicht in der Lage, eine biochemisch relevante Definition einer Tumorzelle zu geben (9,24). Das mangelnde Wissen um die feinen Unterschiede zwischen Tumorzelle und Normalzelle zwingt zur Empirie in der Erforschung zytostatisch wirksamer Pharmaka. Erst wenn uns die Kriterien der Krebsentstehung bekannt sind, werden wir "maßgeschneiderte", d.h. selektiv auf die Tumorzelle wirkende Chemotherapeutika finden (27).
Auch die Erfolge der operativen und Strahlentherapie konnten trotz größter Anstrengungen bis heute nicht erreicht werden. Das Hauptproblem bei der Suche nach zytostatischen Substanzen ist ihre mangelnde Selektivität, d.h. der geringe Unterschied

zwischen einer normalen und einer Krebszelle erlaubt es nicht ein Pharmakon zu verwenden, das erstere unbeeinflußt läßt, das aber gleichzeitig an der Krebszelle zytostatisch wirksam wird.

Resistenztestung gegenüber Zytostatika

Durch die Weiterentwicklung der Methoden in der Zell- und Gewebekultur ist es möglich geworden, faktisch jedes Gewebe in vitro zu kultivieren, mit der Möglichkeit die Wirkung bestimmter Substanzen unter kontrollierten und definierten Bedingungen außerhalb des Organismus zu untersuchen.
Bei Benutzung dieses pharmakologischen Modells, wie es die Gewebekultur darstellt, muß die Forderung erfüllt werden, daß sie weitgehend natürlichen Gegebenheiten entspricht und repräsentativ ist. Davon hängt letztlich ihr medizinischer Wert ab, und er wird daran gemessen, inwieweit die in vitro Befunde auf in vivo Verhältnisse übertragbar sind (28).
Das sind die Voraussetzungen für individuelle Sensibilitäts- und Resistenzbestimmungen (Antibiogramme, Onkobiogramme).

Dabei zeichnen sich zwei Richtungen ab:

1. Cytologisch-morphologische Beurteilung nach Inkubation mit Testsubstanzen,
2. Radiochemische Untersuchungen mit markierten Nucleinsäurevorläufern (Autoradiographie, Flüssigkeitsszintillationsmessung).

Einteilung der Zytostatika (modifiziert nach Schmähl (24)

Unter Zytostatika versteht man im weitesten Sinne alle Substanzen, die Zellen in Wachstum und Vermehrung hemmen können, im allgemeinen jedoch Substanzen zur Therapie von Tumoren und generalisierten neoplastischen Erkrankungen verwendet werden. Die Wirkung ist aber nicht absolut spezifisch (selektiv), denn es werden auch physiologisch schnell wachsende Gewebe alteriert (9).

Man unterscheidet in der Hauptsache folgende Gruppen (in Klammern die Namen der in dieser Arbeit verwendeten Substanzen)

Tabelle 1:

I. Alkylierende Substanzen
(Endoxan^{R}, Thio Tepa^{R}, Trenimon^{R})

II. Pflanzliche Alkaloide
(Velbe^{R}, Proresid^{R}, VM 26)

III. Antibiotika
(Actinomycin D)

IV. Antimetaboliten
(Methotrexat^{R})

V. Enzyme
(Asparaginase)

VI. Hormone
(Norgestrel, Hydroxynorprogesteroncapronat, 5-Etiensäure-Methylester, Dehydroepiandrosteron-Lauryl-Sulfat)

Eine Sonderstellung nehmen die Hormone ein, einmal bezüglich der allgemeinen Nebenwirkungen, die vergleichbar gering sind, da es sich nicht um allgemein zytostatische Substanzen handelt, zum anderen werden sie hauptsächlich zur Behandlung von Karzinomen hormonabhängiger Organe eingesetzt, die hormonell induziert und auch hormonell beeinflußbar sind.

Hormone in der Krebs-Chemotherapie

Es ist bekannt, daß das Mammakarzinom der Frau in der Schwangerschaft schneller und bösartiger verläuft, daß andererseits ovariektomierte Frauen sehr viel seltener an einem Mammakarzinom erkranken als gleichalterige Vergleichsfälle.
Außerdem ist bekannt, daß kastrierte Männer fast nie an Prostatakarzinom erkranken.
Die Chemotherapie nahm von diesen Befunden und ihrer Interpretation ihren Ausgang (1).
Friedrich und Freska (4) folgerten aus den oben beschriebenen Phänomenen, daß Hormone in das Krebsgeschehen eingreifen, aber nur bei Organen die schon normalerweise hormonell gesteuert werden. Sie wirken krebsbegünstigend sobald sie infolge Überdosierung das Wachstum und die Proliferation

steigern, ohne selbst kanzerogen zu wirken.
Die Befunde lassen nach Bauer (1) weiterhin den Schluß zu, daß durch eine entscheidende Beeinflussung des hormonellen Milieus, z.B. durch Keimdrüsenextirpation, auch die Karzinome hormonabhängiger Organe entscheidend gehemmt werden können. Das hormonelle Milieu kann ebenso durch die Verabreichung andersgeschlechtlicher Hormone geändert werden, wie z.B. bei der Androgenbehandlung des Mammakarzinoms. Keimdrüsenextirpation und Behandlung mit andersgeschlechtlichen Hormonen nennt man auch paradoxe oder antihormonelle Therapie.

Wirkungsmechanismus der Hormone

Wie können Hormone, die für das eine Geschlecht physiologische Substanzen sind, Krebszellen im Organismus des anderen Geschlechts im Sinne einer Hemmwirkung beeinflussen?
Karlson geht davon aus, daß die Hormone als "chemische Substanzen" nur chemisch wirken können, d.h. sie müssen mit irgendwelchen anderen Stoffen in den Zellen des Erfolgsorgans reagieren: "Die Wirkungen der Hormone sind die Folgen eines Primärprozesses, dessen Mechanismus uns im Einzelnen noch nicht bekannt ist." (10)

Er faßt die biochemische Wirkungsweise der Hormone in drei Theorien zusammen:

1. Hormone wirken durch Beeinflussung (Aktivierung oder Hemmung) bestimmter Enzymsysteme in der Zelle.
2. Hormone bewirken in erster Linie Permeabilitätsveränderungen der Zellmembran oder intrazellulärer Strukturen (z.B. Mitochondrien).
3. Hormone wirken durch Aktivierung oder Hemmung bestimmter Genorte, durch deren Aktivität weitere Reaktionen in Gang gesetzt werden (z.B. Proteinbiosynthese etc.).

Dabei soll vor allem dem letzten Punkt besondere Bedeutung zukommen, wobei der Mechanismus der Informationsübertragung so zu verstehen ist, daß das Hormon zunächst von einem im Zytoplasma der Zelle befindlichen Rezeptor-Protein gebunden und dabei so verändert wird, daß der nun entstandene Rezeptor-Protein-Hormon-Komplex in den Kern gelangen kann, um dort auf der Stufe der Transskription am Kernchromatin anzugreifen (5).
Andere Untersuchungen bestätigen die erste Theorie: So haben z. B. eine Reihe von Androgenderivaten einen hemmenden Effekt auf das Schlüsselenzym des Pentosephosphatzyklus, die Glucose-6-Phosphat-Dehyrogenase (22).

Therapie mit Gestagenen und Androgenen

a) Gestagene (29,31)

Sie werden zunehmend zur Behandlung gynäkologischer Tumoren eingesetzt, dabei eignen sich besonders die Steroide, die einen stark anti-östrogenen Effekt haben. Die Nebenwirkungen einer hochdosierten Gestagentherapie sind im Vergleich zur Androgentherapie relativ gering (z.B. Virilisierung).

Über den Wirkungsmechanismus ist nicht sehr viel bekannt. Es werden neben dem bekannten zentralen Angriffspunkt (Zwischenhirn - HVL - Erfolgsorgan) auch noch periphere Angriffspunkte diskutiert.

Dafür sprechen die Beobachtungen von Kistner, daß Gestagene in hohen Dosen, z.B. auf das Endometrium und bis zu einem bestimmten Grad auch für das Karzinom zunächst dezidualisierend, dann atrophierend wirken kann.

Kaiser stellte fest, daß Gestagene, die für den Malignitätsgrad und die Progredienz pathognomischen Mitosen im malignen Gewebe bedeutend reduzieren (31). Eine hochdosierte Gestagentherapie ist nicht nur in der Lage, das Wachstum des Primärtumors zu beeinträchtigen, sondern auch Metastasen zum verschwinden zu bringen.

b) Androgene

Ob und in welcher Form Androgene bei gynäkologischen Tumoren therapeutisch eingesetzt werden können, ist keineswegs endgültig entschieden. Neben einem zentralen Effekt, wobei über das Zwischenhirn - HVL-Erfolgsorgan-System eine hormonale Umstimmung erzielt werden soll, wird auch hier ein peripherer Angriffspunkt diskutiert. Zur Therapie mit Androgenen muß jedoch einschränkend gesagt werden, wie das bei Inkubation von Tumorgeweben bzw. Zellkulturen gezeigt werden konnte, daß das heterotypische Hormon ebenso wie die Gestagene nicht immer einen hemmenden Einfluß auf das Tumorwachstum ausüben. Deshalb sollte eine Hormontherapie und auch die zytostatische Therapie nur dann erfolgen, wenn die Sensibilität des speziellen Tumorgewebes prätherapeutisch nachgewiesen ist (11, 29, 31).

Regulation des Zellwachstums

Jedes höher organisierte Lebewesen unterliegt einer Wachstumsregulation dergestalt, daß die Gewebe- und Zellkonstanz des erwachsenen Individuums gewährleistet ist.

Die Gewebekonstanz wird als dynamisches Fließgleichgewicht zwischen Zellneubildung und Zelluntergang verstanden. Dieses Gleichgewicht ist bei einem Tumor gestört, d.h. er reagiert nicht mehr auf die Regulationsimpulse seines Wirtsorganismus.
Zur Erklärung stehen folgende Behauptungen zur Diskussion:

1. der Organismus sendet keine Regulationsimpulse mehr für das spezifische Gewebe aus,
2. die Zellen reagieren nicht mehr auf die Regulationsimpulse (27).

Ein bestimmter Zellverband ist nun in seinem Wachstum autonom geworden, er unterliegt nicht mehr den Wachstumsgesetzen des Gesamtorganismus.
Neuere Untersuchungen sprechen dafür, daß in diesen Regulationsmechanismus die Chalone, gewebsspezifische, jedoch nicht artspezifische Hemmer der Zellteilung eine entscheidende Rolle spielen. Allerdings weiß man bisher wenig über Angriffspunkt und Wirkungsweise dieser Regulatoren (17, 27).
Für die Folgen dieser Störungen werden zwei Mechanismen diskutiert (2):

1. gesteigerte Zellneubildung bei normalem Zelluntergang,
2. normale Zellneubildung bei verzögertem Zelluntergang.

Zellzyklus der Einzelzelle

Im Leben einer Zelle gibt es zyklische Abläufe, die man unterteilen kann in (7,37)

1. Interphase = Zeit zwischen zwei aufeinanderfolgende Teilungen,
2. Mitose = Zellteilung.

Die Interphase stellt die Arbeitsform der Zelle dar. Sie läßt sich in verschiedene Phasen einteilen, wobei der S-Phase besondere Bedeutung zukommt, weil sie die Verdoppelung der Chromosomensubstanz (= DNS-Synthese) vor jeder Mitose zu gewährleisten hat. Das erfolgt durch die identische Reduplikation, bei der sich die beiden Polynukleotidstränge, die die DNS-Doppelspirale zusammensetzen, streckenweise entspiralisieren. An die nun frei gewordenen Bindungen der Basen werden die Triphosphate der komplementären Nukleoside Andenosin, Guanosin, Cytidin, Thymidin angelagert und enzymatisch zu einer neuen Polynukleotidkette vereinigt (7,34).

Thymin-Nucleotid als Vorläufer der DNS

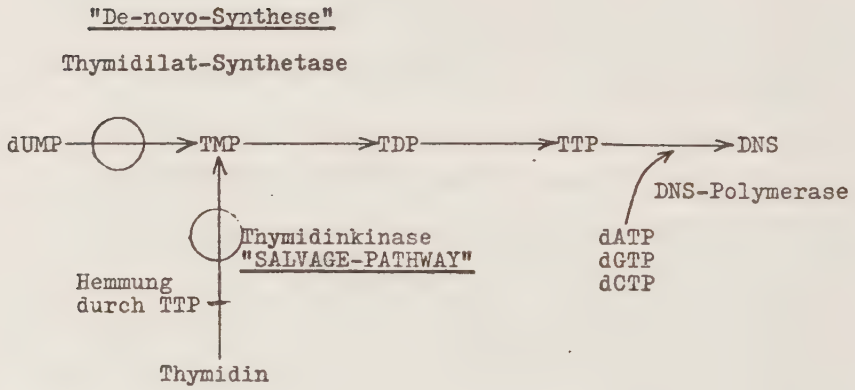
Die Mehrzahl der heute gebräuchlichen Zytostatika beeinflussen primär oder sekundär den Nukleinsäurestoffwechsel.

Aus diesem Grund wird häufig die Untersuchung des Nucleinsäurestoffwechsels von Tumorzellen mit Hilfe radioaktiver Vorläufer für Sensibilitätstests in vitro benutzt. Dabei dient die Hemmung der Vorläuferinkorporation bei Anwesenheit von Zytostatika, nach autoradiographischer oder radiochemischer Auswertung, als Maß für die Wirkung der Substanz.

Wir benutzen den H^3-Thymidineinbau als Parameter für das Ausmaß der DNS-Synthese (Hemmung oder Steigerung) und vergleichen dabei Gewebe unter Normalbedingungen (Kontrolle) und nach Zusatz der Hormone (Androgene und Gestagene). Thymidinmonophosphat als Vorläufer des in die DNS einzubauenden Thymidintriphosphates kann auf zwei Synthesewegen entstehen (14,35):

1. De-novo Synthese aus dUMP mit Hilfe der Thymidilat-Synthetase,
2. aus präformiertem Thymidin, über den salvage-pathway, mit Hilfe der Thymidinkinase.

Abb. 1: Schema der Thymin-Nucleotid-Synthese



dUMP = Desoxyuridinmonophosphat

TMP = Thymidinmonophosphat

TDP = Thymidindiphosphat

TTP = Thymidintriphosphat

dATP = Desoxyadenosintriphosphat

dGTP = Desoxyguanosintriphosphat

dCTP = Desoxycytidintriphosphat

II. THEMASTELLUNG

Angesichts der immer größer werdenden Zahl von Krebs-Chemotherapeutika mit ihrer mangelnden Selektivität ist es für den Kliniker sehr problematisch im konkreten Einzelfall eine wirkungsvolle Therapie durchzuführen, die zugleich dem Patienten unnötige Belastungen und Nebenwirkungen ersparen.
Deshalb wäre es sehr sinnvoll, in prätherapeutischen Sensibilitätstests Aussagen über das individuelle Verhalten eines Tumors gegenüber den zur Verfügung stehenden Zytostatika zu erhalten.
Neben den herkömmlichen Zytostatika werden vor allem in der Gynäkologie in größerem Umfang Hormone in der Krebs-Chemotherapie verabreicht.

Bisher wurde an der Universitätsfrauenflinik Homburg/Saar der Krebs-Chemotherapie-Resistenztest routinemäßig nur mit den herkömmlichen Zytostatika (Tab. 1, Tab. 2) durchgeführt, wobei folgende morphologische Kriterien beurteilt wurden: Vakuolisierung, Karyorhexis, Adhäsion an der Glaswand, Nekrosen.

Mit dieser Methode wurden folgende Substanzen untersucht:

Zwei Gestagenderivate: - Hydroxynorprogesteroncapronat
- Norgestrel

Zwei Androgenderivate: - Dehydroepiandrosteron-Lauryl-Sulfat = DHEA-LS
- 5-Etiensäuremethylester = EME

sowie acht herkömmliche Zytostatika (Tab. 1, Tab. 2).

Um die Wirkung der Hormone mehr nach biochemisch-funktionellen und quantitativen Gesichtspunkten beurteilen zu können, werden zwei Methoden beschrieben, bei denen die Wirkung der zwei Gestagenderivate und der zwei Androgenderivate am Einbau eines markierten Nucleinsäurevorläufers - H^3-Thymidin - in die DNS gemessen wird, besonders auch im Hinblick darauf inwieweit diese Methoden auch für die routinemäßige Resistenztestung brauchbar sind.

III. MATERIAL UND METHODE

1. Untersuchte Gewebearten

Das Gewebe entstammt Operationspräparaten der Universitätsfrauenklinik Homburg. Die Untersuchungen wurden an 19 Primärkulturen mit insgesamt 217 Einzeltests vorgenommen. Es ergibt sich folgende Aufgliederung:

8 Ovarialkarzinome
1 Ovarialfibrom
4 Mammakarzinome
1 Plattenepithelkarzinom der Harnblase
3 normale Endometrien in der Proliferationsphase
2 normale Endometrien in der Sekretionsphase

2. Verwendete Substanzen

Tabelle 2:

Hormone

a)	Hydroxynorprogesteroncapronat	17 γ/ml
b)	Norgestrel	20 γ/ml
c)	DHEA-LS	5,34 γ/ml
d)	EME	3,32 γ/ml

Zytostatika

a)	Endoxan (Asta)	50,00 γ/ml
b)	Trenimon (Bayer)	0,01 γ/ml
c)	Proresid (Sandoz)	20,00 γ/ml
d)	VM 26 (Sandoz)	1,00 γ/ml
e)	Thio Tepa (Lederle)	0,40 γ/ml
f)	Methotrexat (Lederle)	1,00 γ/ml
g)	Velbe (Lilly)	3,30 γ/ml
h)	Actinomycin D	0,10 γ/ml

Die Konzentrationen entsprechen einer Stoßtherapie, bezogen auf 60 kg Körpergewicht bzw. 5 l Blut (2,8).
DHEA-LS und EME wurden in der Abteilung für experimentelle Endokrinologie der Universitätsfrauenklinik Mainz synthetisiert und freundlicherweise von Prof. Dr. med. G.W. Oertel zur Verfügung gestellt, wobei es sich bei EME um ein C-20-Androgenderivat handelt, das vollkommen neu ist und bisher nicht in der Therapie angewendet wurde.

3. Kultivierung der Gewebe

Aufarbeitung und Kultivierung der Gewebe nach dem Verfahren von Dulbecco und Vogt (3), in der Modifikation nach Limburg und Krahe (15).

Arbeitsgang:

- Entnahme eines Anteils aus dem Tumor für die Histologie.
- Das zur Kultivierung steril entnommene Gewebe wird sofort in Phosphatpuffer mit Antibiotikazusatz aufgenommen.
- Präparation des Gewebes: Entfernung von Blut und nekrotischen Teilen, Waschen und Spülen.
- Mechanische Zerkleinerung mit einer Schere bis zum Gewebsbrei.
- Fermentative Aufspaltung der Gewebsfragmente durch eine 0,25 - 2 %tige Trypsinlösung unter ständigem Rühren mit Hilfe eines Magnetrührers bei 37 °C.
- Gelöste Einzelzellen werden in einen zweiten sterilen Kolben gegossen; Abstoppung der Trypsinisierung mit Hilfe eines Eisbades von 4 °C. Mehrmals wiederholen bis keine soliden Gewebsfragmente mehr vorhanden sind.
- Nach Abschluß der Trypsinisierung wird die Zellsuspension durch eine Mullage filtriert.
- Mehrmalige Zentrifugation (800 - 1000 Upm) und Resuspension in Phosphatpuffer zur Entfernung des Trypsins.
- Zellsediment wird in Nährmedium TCM 199 aufgenommen, Verdünnung bis zu einer Zellzahl von 350 000/ml.
- Explantation in Zuchtröhrchen in Portionen zu 1 ml.

- 24-stündliche Kontrolle des Wachstums und Nachfütterung.
- Nachdem die Einzelzellen zu einem flächenhaften Rasen (Monolayer) ausgewachsen waren (24 - 48 Std.; ca. 4 Mill. Zellen/Röhrchen), Zusatz der Testsubstanzen in den unter Tab. 2 angegebenen therapieadäquaten Dosen.
- Nach 24-stündiger Inkubation der Testsubstanzen, Ablesung der morphologischen Testergebnisse im Umkehrmikroskop.

H^3-Thymidin-Inkorporation

Irreversible morphologische Veränderungen innerhalb einer Zelle haben ihr Korrelat in bestimmten biochemischen Störungen. Sie werden jedoch erst sichtbar, wenn diese Störungen des Zellstoffwechsels einen bestimmten Grad erreicht haben. Der H^3-Thymidineinbau stellt eine Methode dar, die Wirkung verschiedener Einflüsse (z.B. Strahlen, Pharmaka etc.) auf den Stoffwechsel der Zelle zu messen mit dem Ziel, eine Aussage über Sensibilität oder Resistenz einer Zellkultur zu erhalten.

Arbeitsgang:

- Für jedes zu testende Hormonpräparat wird ein Kulturröhrchen angelegt, zu dem nach 20-stündiger Inkubation, d.h. 4 Stunden vor Ablauf der Inkubationszeit, 2 ml H^3-Thymidin (4 µC/ml) (bezogen von der Firma Buchler, Braunschweig) gegeben wird. (Spez. Aktivität 2 C/m Mol.).
- Als Kontrollen dienten 1 Röhrchen, das keine Zusätze bekam und 1 Röhrchen, dem keine Testsubstanz zugefügt war, jedoch 4 Stunden vor Ablauf der Inkubation 2 ml H^3-Thymidin zugegeben wurde, nachdem es wie die übrigen Röhrchen mit 1 ml TCM 199 auf ein Volumen von 2ml gebracht worden war (1 ml Zellsuspension + 1 ml gelöste Substanz bzw. 1 ml Zellsuspension + 1 ml TCM 199).
- Am Ende der Inkubationszeit wurden die Röhrchen für 3 Minuten bei 800 - 1000 Upm zentrifugiert, der Überstand dekantiert, dem Kulturröhrchen wieder 1 ml TCM 199, zum Waschen zwecks Entfernung des extrazellulären nicht eingebauten H^3-Thymidins, hinzugegeben. Dieser Vorgang wurde 3x wiederholt. Danach wurden die Kulturröhrchen mit 1 ml Nährlösung TCM 199 versetzt und dann eingefroren.
- Zur Weiterverarbeitung wurden die gesammelten Röhrchen wieder aufgetaut, die Nährlösung in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und anschließend 2x mit 2 ml phys. NaCl gewaschen. Die Flüssigkeit wurde wieder in das Zentrifugenröhrchen gegeben.

- Um die Zellbruchstücke, die sich in der Nährlösung bzw. in der Waschflüssigkeit befunden haben zu erhalten, wurde bei 0 °C, 33 000 Upm (= 80 000 g) 60 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt.
- Das Sediment wurde in 0,5 ml Digitonin (0,02 %) aufgenommen, die Röhrchen 2x auf einem Whirlmix geschüttelt und die Flüssigkeit in ein Szintillations-Meßröhrchen gegeben.
- Genauso wurde mit den Kulturröhrchen verfahren: Zugabe von 0,5 ml Digitonin (0,02 %), 2x schütteln. Der Inhalt wird ebenfalls in das Szintillations-Meßröhrchen gegeben, ebenso die 2x 1 ml phys. NaCl, mit der die Kulturröhrchen ausgespült wurden.
- Der Gesamtinhalt des Szintillations-Meßröhrchens betrug 5 ml, davon wurde 1 ml in ein anderes Meßröhrchen abpipettiert, 9 ml Dioxan-Naphtalin-Szintillator (5 g PPO + 0,5 g bis - MSB (Packard) + 120 g Naphtalin) hinzugefügt und dann im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (Tracerlab) gemessen (30).

Die zuvor beschriebene Methode erwies sich bei der Durchführung als zeitraubend und langwierig, und ist deswegen für einen Routine-Resistenztest wenig geeignet.

Wir wendeten deshalb die nach Süss (26) und Volm (32,33) modifizierte Methode von Mans und Novelli (16) zur Aufarbeitung radioaktiv markierter Zellen an, bei der die H^3-Thymidin-Inkorporation in die DNS gemessen wird. Sie ist anderen Methoden deswegen überlegen, weil mit ihr zahlreiche Proben gleichzeitig mit relativ geringem Arbeitsaufwand bestimmt werden können, und bietet sich deshalb für eine Routineresistenztestung an (32).

Arbeitsgang:

- Das Gewebe wird nach der von Limburg und Krahe (15) angegebenen Methode aufgearbeitet.
- Nach Beendigung der Inkubationsdauer werden die Röhrchen jeweils mit 10 µl SDS versetzt, sofort in ein Wasserbad von 56 °C gestellt und von Zeit zu Zeit geschüttelt. (SDS = Na-dodecylsulfat 10 % ist ein Detergenz, das die Zellen von der Glaswand ablöst und die Zellmembranen zerstört; die Temperatur von 56 °C ist notwendig um die Nucleasen zu inaktivieren).

- Aus dem aufgeschüttelten Inhalt jedes Röhrchens werden 3x 100 l auf jeweils 3 zuvor gekennzeichnete und mit einer Stecknadel auf einer Styroporplatte befestigten Rundfilter pipettiert (Whatman 3 MM, 2, 3 CMS).
- Die Rundfilter werden sofort in warmer Luft getrocknet und für 15 Minuten in eiskalte 10%ige Trichloressigsäure gelegt (1 l/100 Stück).
- Zur weiteren Extraktion werden sie dann 60 Minuten in eiskalte 5 %ige Trichloressigsäure gelegt.
- Die Rundfilter werden dann für 10 Minuten in 96 %igem Alkohol gewaschen und an der Luft getrocknet.
- Daran anschließend wurden sie in Szintillations-Meßgläschen gelegt, die 10 ml Toluolszintillator (50 mg POPOP und 4 g PPO/l) enthielten.
- Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (Tracerlab).

IV. ERGEBNISSE

1. Morphologische Beurteilung (Tab. 3 - 7)

Die Wirkung der Hormone wurde mit dem standartisierten Krebs-Chemotherapie-Resistenztest geprüft.
Ebenso wurden zum Vergleich Primärkulturen der gleichen Gewebe gegenüber einer Reihe der herkömmlichen Zytostatika untersucht.

Zusammenfassend läßt sich folgendes sagen:

a) trotz gleicher Histologie wiesen die untersuchten Primärkulturen der Ovarial- und Mammacarcinome hinsichtlich morphologischer Veränderungen nur gegenüber DHEA-LS und EME unterschiedliches Verhalten auf, wie es entsprechend der Tumorindividualität zu erwarten war.

b) auffallend war das uniforme Verhalten der Ovarial- und Mammacarcinome gegenüber Hydroxynorprogesteroncapronat und Norgestrel. So waren gegenüber ersterem mit Ausnahme einer Kultur alle übrigen gegenüber Norgestrel resistent.

c) gegenüber VM 26, Thio Tepa und Methotrexat waren alle Kulturen resistent. Bei den restlichen Zytostatika konnte das bekannte unterschiedliche morphologische Verhalten beobachtet werden.

Tabelle 3: Morphologische Beurteilung von Primärkulturen maligner und normaler Gewebe nach Inkubation mit EME

	n	zytost. Effekt	kein Effekt
Ovarial-Ca	8	5	3
Ovarial-Fibrom	1	1	-
Mamma-Ca	4	3	1
Plattenepithel-Ca der Harnblase	1	1	-
Prolif. Endometr.	3	-	3
Sekret. Endometr.	2	2	-

Tabelle 4: Morphologische Beurteilung von Primärkulturen maligner und normaler Gewebe nach Inkubation mit DHEA-LS

	n	zytost. Effekt	kein Effekt
Ovarial-Ca	8	2	6
Ovarial-Fibrom	1	1	-
Mamma-Ca	4	3	1
Plattenepithel-Ca der Harnblase	1	1	-
Prolif. Endometr.	3	-	3
Sekret. Endometr.	2	1	1

Tabelle 5: Morphologische Beurteilung von Primärkulturen maligner und normaler Gewebe nach Inkubation mit Hydroxynorprogesteroncapronat.

	n	zytost. Effekt	kein Effekt
Ovarial-Ca	8	1	7
Ovarial-Fibrom	1	-	1
Mamma-Ca	4	-	4
Plattenepithel-Ca der Harnblase	1	-	1
Prolif. Endometr.	3	-	3
Sekret. Endometr.	2	-	2

Tabelle 6: Morphologische Beurteilung von Primärkulturen maligner und normaler Gewebe nach Inkubation mit Norgestrel

	n	zytost. Effekt	kein Effekt
Ovarial-Ca	8	-	8
Ovarial-Fibrom	1	-	1
Mamma-Ca	4	-	4
Plattenepithel-Ca der Harnblase	1	-	1
Prolif. Endometr.	3	-	3
Sekret. Endometr.	2	-	2

Tabelle 7: Morphologische Beurteilung der Gewebekulturen maligner Zellen nach Inkubation mit 8 verschiedenen Zytostatika
(+ = Effekt, - = kein Effekt)

	n	Ovarial-Ca +	Ovarial-Ca -	Ovarial-Fibr. +	Ovarial-Fibr. -	Mamma-Ca +	Mamma-Ca -	Plattenepithel-Ca +	Plattenepithel-Ca -
Endoxan	14	1	7	0	1	1	3	0	1
Treminon	14	1	7	0	1	1	3	1	0
Proresid	14	6	2	1	0	4	0	1	0
VM 26	14	1	7	0	1	0	4	0	1
Thio-Tepa	14	0	8	0	1	0	4	0	1
Methotrexat	14	0	8	0	1	0	4	0	1
Velbe	14	7	1	1	0	4	0	1	0
Actinomyc.	14	7	1	1	0	3	1	1	0
Summe jeweils		8		1		4		1	

2. Ergebnisse der H^3-Thymidin-Inkorporation (Tab. 8 - 12)

Die Beeinflussung des H^3-Thymidineinbaus in Zellkulturen kann als Parameter für die Wirkung von zytostatischen Substanzen, bzw. aller Substanzen, die auf den Zellstoffwechsel einwirken, benutzt werden (28). Bei Auswertung der radiochemischen Ergebnisse ergeben sich folgende Befunde: Das tumorindividuelle Verhalten ist trotz gleicher Histologie wesentlich ausgeprägter als bei den morphologischen Befunden. Vor allem scheint der Vergleich zu den zytologisch-morphologischen Beobachtungen interessant.

Hydroxynorprogesteroncapronat

Während bei der morphologischen Beurteilung sich 18 Kulturen als resistent erwiesen, ergeben sich bei Messung der H^3-Thymidin-Inkorporation nur 4 resistente Kulturen, während 11 sensibel sind und 4 sogar eine Zunahme der H^3-Thymidin-Inkorporation zeigen.

Norgestrel

Hier fällt das Ergebnis ähnlich wie beim Hydroxynorprogesteroncapronat aus. Alle Kulturen, also 19 Stück, erwiesen sich bei

der morphologischen Auswertung als resistent. Das radiochemische Ergebnis zeigt jedoch 13 sensible, 2 resistente und 4 Kulturen mit einer Zunahme der H^3-Thymidin-Inkorporation.

DHEA-LS

Von wenigen Ausnahmen abgesehen (Tab. 11) ergeben sich hier gute Übereinstimmungen mit der Morphologie. Auffallend sind nur die Befunde beim Plattenepithelkarzinom der Harnblase und bei einem Mammakarzinom, bei denen sich morphologisch zwar ein Effekt zeigt, der Thymidineinbau jedoch ansteigt.

EME

Die Übereinstimmungen mit der Morphologie sind relativ gut (Tab. 12), von 2 Befunden abgesehen. Beim Plattenepithelkarzinom der Harnblase und dem Ovarial-Fibrom werden morphologische Effekte beobachtet, während der Thymidineinbau jedoch zugenommen hat.

Tabelle 8 gibt die quantitativen Ergebnisse der H^3-Thymidin-Inkorporation wieder und diente zur Aufstellung der folgenden Tabellen.

Tabelle 8: Hemmung der H^3-Thymidin-Inkorporation durch Androgene (EME, DHEA-LS) und Gestagene (Hydroxynorprogesteroncapronat, Norgestrel) in %, bezogen auf Kontrollen, denen keine Testsubstanzen zugesetzt wurden (= 100 %).

	EME	DHEA-LS	Prog.	Norg.
Ovarial-Ca	- 64	- 30	- 15	- 12
	- 13	- 7	- 91	+ 34
	+ 3	- 12	- 26	- 39
	+ 13	+100	+200	+ 2
	- 27	+100	- 31	- 14
	- 17	- 9	- 33	- 26
	+ 81	+ 25	+134	+ 25
	- 39	- 37	- 30	- 40
Ovarial-Fibrom	+ 77	- 29	+ 6	+ 26
Mamma-Ca	- 66	- 81	- 80	- 70
	- 23	+ 15	- 25	- 23
	- 6	- 29	+ 3	- 26
	+144	+ 40	- 25	- 25
Plattenepithel Ca Harnblase	+ 5	+ 89	+ 17	+ 9
Norm. Endom. i. d. Proliferationsph.	+ 40	+ 49	+ 83	- 12
	- 5	+ 21	+ 8	- 66
	- 41	57	- 24	+ 58
Norm. Endom. i. d. Sekretionsph.	- 20	- 37	- 11	- 40
	- 34	+ 35	- 20	- 20

Tabelle 9: Der Einfluß von Hydroxynorprogesteroncapronat auf den Einbau von H^3-Thymidin in malignes und normales Gewebe in der Primärkultur.

	n	Abnahme	Zunahme	kein Effekt
Ovarial-Ca	8	6	2	-
Ovarial-Fibrom	1	-	-	1
Mamma-Ca	4	3	-	1
Plattenepithel-Ca der Harnblase	1	-	1	-
Prolif. Endometr.	3	1	1	1
Sekret. Endometr.	2	1	-	1

Tabelle 10: Der Einfluß von Norgestrel auf den Einbau von H^3-Thymidin in malignes und normales Gewebe in der Primärkultur

	n	Abnahme	Zunahme	kein Effekt
Ovarial-Ca	8	5	2	1
Ovarial-Fibrom	1	-	1	-
Mamma-Ca	4	4	-	-
Plattenepithel-Ca der Harnblase	1	-	-	1
Prolif. Endometr.	3	2	1	-
Sekret. Endometr.	2	2	-	-

Tabelle 11: Der Einfluß von DHEA-LS auf den Einbau von H^3-Thymidin in malignes und normales Gewebe in der Primärkultur

	n	Abnahme	Zunahme	kein Effekt
Ovarial-Ca	8	3	3	2
Ovarial-Fibrom	1	1	-	-
Mamma-Ca	4	2	1	1
Plattenepitheli-Ca der Harnblase	1	-	1	-
Prolif. Endometr.	3	-	3	-
Sekret. Endometr.	2	1	1	-

Tabelle 12: Der Einfluß von EME auf den Einbau von H^3-Thymidin in malignes und normales Gewebe in der Primärkultur

	n	Abnahme	Zunahme	kein Effekt
Ovarial-Ca	8	5	2	1
Ovarial-Fibrom	1	-	1	-
Mamma-Ca	4	3	1	-
Plattenepithel-Ca der Harnblase	1	-	-	1
Prolif. Endometr.	3	1	1	1
Sekret. Endometr.	2	2	-	-

Die Wirkung von Androgenderivaten (EME, DHEA-LS, DHEA) und Gestagenderivaten (Hydroxynorprogesteroncapronat, Norgestrel) auf die H^3-Thymidin-Inkorporation in Primärkulturen von Endometriumskarzinomen in %, bezogen auf Kontrollen, denen keine Testsubstanzen zugesetzt wurden.
Die Zahlen hinter den Substanzbezeichnungen 3 bzw. 5 geben die verwendeten Konzentrationen 10^{-3} bzw. 10^{-5}M an.

Tabelle 13:

	I.		II.		III.	
	H^3-T-Ink.	Morph.	H^3-T-Ink.	Morph.	H^3-T-Ink.	Morph.
EME 5	-48	+	-70	+	-19	+
DHEA-LS 5	-47	+	-61	+	-14	+
DHEA 3	-27	+	-56	+	-32	+
DHEA 5	-21	+	-10	+	+11	*
Norgestrel 3	-45	+	-60	+	-15	+
Norgestrel 5	-47	+	-58	+	+ 5	*
Hydroxynor-prog. cap. 3	-36	+	-17	+	+ 5	*
Hydroxynor-prog. cap. 5	-42	+	-12	+	+ 5	*

+ = morphol. Effekt

* = Zellen stellenweise gelöst, ansonsten intakter Zellrasen.

Zu den Ergebnissen der nach dem von Volm und Süss angegebenen Verfahren getesteten Gewebe läßt sich zusammenfassend folgendes sagen:

a) die Karzinome I und II sind vollständig sensibel gegenüber allen Substanzen, Karzinom III zeigt teils abgeschwächte Sensibilität, teils Resistenz.

b) die Sensibilität der Karzinome I und II ist am größten gegenüber EME und DHEA-LS, während Karzinom III bei DHEA 3 die größte Sensibilität zeigt.

c) die Messung der H^3-Thymidininkorporation zeigt, daß alle 3 Karzinome ein ausgesprochen individuelles Verhalten, trotz gleicher Histologie, haben.

d) es besteht kein proportionales Verhältnis von Wirkstoffkonzentration und Hemmeffekt.

V. DISKUSSION

Trotz einiger Vorbehalte in der Gewebekultivierung - Schaffung annähernd natürlicher Verhältnisse, Auspflanzung repräsentativer Gewebebezirke - haben sich die prätherapeutischen Sensibilitätstests für die Klinik als brauchbar erwiesen, wobei die Übereinstimmung zwischen Zytotoxizität in vitro und antineoplastischer Wirkung in vivo mit ca. 50 - 70 % angegeben wird (28).

Seit etwa 10 Jahren wird an der Universitätsfrauenklinik in Homburg/Saar, der von Limburg und Krahe entwickelte Krebs-Chemotherapie-Resistenztest durchgeführt. Es konnte auch gezeigt werden, daß sich beim Vergleich autoradiographischer Ergebnisse mit den zytologisch-morphologischen Befunden des Resistenztests gute Übereinstimmungen ergaben (2).

Die Autoradiographie eignet sich gut zur Messung der Proliferationsaktivität bestimmter morphologisch definierter Zellen. Für Resistenztests wäre es jedoch nützlich, den mittleren Einbauwert in eine Gewebekultur zu messen, dafür ist aber die Genauigkeit der autoradiographischen Methode durch bestimmte Faktoren begrenzt (36):

1. Bei Auszählung einer nur geringen Anzahl von Zellen können sich bei Geweben mit niedrigem H^3-Thymidin-markierungsindex statistische Fehler ergeben.
2. Da nur wenige, meist sogar nur eine, Stichproben der betreffenden Tumorgewebe zur Untersuchung gelangen, setzt diese Methode eine homogene Verteilung der DNS-synthetisierenden Zellen voraus. In den meisten menschlichen Tumoren ist diese Voraussetzung jedoch nicht gegeben.
3. Sowohl der Arbeitsgang (z.B. Expositionszeit), als auch die Auszählung der Zellen selbst nehmen viel Zeit in Anspruch.

Unsere Untersuchungen sollten einen Weg aufzeigen über die Möglichkeiten den mittleren Einbauwert von H^3-Thymidin in der gesamten Gewebekultur zu messen, um damit einen Querschnitt von der Proliferationsaktivität aller Zellen im untersuchten Material zu erhalten.

Interessant erschien der Vergleich der so gewonnenen Ergebnisse mit denen der morphologischen Beurteilung, wobei zunächst die geringe Zahl der Übereinstimmungen, die etwa bei 25 % liegt, auffällt.

Bei der Betrachtung der Tabellen fallen Konstellationen auf, die widersprüchlich scheinen:

1. kein zytostatischer Effekt - Abnahme des H^3-Thymidineinbaus
2. kein zytostatischer Effekt - Zunahme des H^3-Thymidineinbaus
3. zytostatischer Effekt - Zunahme des H^3-Thymidineinbaus

ad 1

Für diesen am häufigsten beobachteten Befund sind zwei Erklärungen möglich:

a) die biochemischen intrazellulären Vorgänge gehen den morphologischen (= sichtbaren) Veränderungen zeitlich voraus.
b) die Summe der biochemischen Veränderungen im Zellstoffwechsel ist nicht so groß, daß daraus morphologische Veränderungen resultieren könnten.

Der Zellstoffwechsel ist viel zu komplex, als daß er sich auf diese einfachen Formeln ohne Berücksichtigung von Temperatur, Wirkstoffkonzentration, Einwirkungszeit, Löslichkeit etc. zurückführen ließe. Es dürfte sich um zwei

nebeneinanderherlaufende Vorgänge, sowohl in der Einzelle als auch in der gesamten Gewebekultur handeln.

ad 2

Stellt die Hemmung des H^3-Thymidineinbaus einen Parameter für die Wirkung einer Substanz auf den Zellstoffwechsel dar, die ihr morphologisches Korrelat in sichtbaren Veränderungen an Zelle und Zellorganellen hat, dann sollte die Kombination dieser Befunde unmöglich sein.
Nach Seidel und Wegner (23) kann von einem erhöhten H^3-Thymidineinbau nicht ohne weiteres auf eine erhöhte DNS-Synthese geschlossen werden. Die Bereitstellung der DNS-Nucleoside ist durch mehrere gekoppelte feed-back-Mechanismen und andere Kompensationsmöglichkeiten reguliert, so daß eine Erhöhung bzw. Erniedrigung des H^3-Thymidineinbaus nicht unbedingt eine Steigerung bzw. Hemmung der DNS-Synthese bedeuten muß.
Bei Einschränkung der De-novo Thymidin-Nucleotid-Synthese hat die Zelle die Möglichkeit, kompensatorisch über den salvagepathway mit Hilfe der Thymidin-Kinase weitere Nucleotide zur Verfügung zu stellen (6,23). Die nun

gemessene erhöhte H^3-Thymidinaktivität wird als Umstellreaktion vom einen Syntheseweg auf den anderen gedeutet, da zunächst in überschießendem Maße Thymidin phosphoryliert wird (6), das dann der Zelle zur DNS-Synthese wieder zur Verfügung steht, kann aber durch negative Rückkopplung des Endproduktes TTP auf die Thymidinkinase wieder gesenkt werden. Mit diesem Mechanismus, Induktion und vermehrte Bildung der Thymidin-Kinase mit der darauf folgenden Endprodukthemmung, könnte man die sekundäre Resistenzentwicklung einer Zellpopulation gegenüber Pharmaka erklären; man könnte auch von einer Adaptation des Tumorgewebes an die Hemmwirkung des Pharmakons sprechen.

ad 3

Die über den salvage-pathway überschießende kompensatorische Produktion phosphorylierten Thymidins hat neben dem negativen Rückkopplungseffekt des TTP auf die Thymidin-Kinase auch einen hemmenden Effekt auf die dCMP Bereitstellung, was eine Verarmung der für die DNS-Synthese notwendigen Nucleoside zur Folge hat, wodurch die DNS-Synthese und somit auch das Zellwachstum eingeschränkt werden (6).

Es bleibt allerdings unklar, auf welcher Stufe des Zellstoffwechsels diese Hormone eingreifen. Nach Untersuchungen von Rindt und Oertel (22) mit dem Androgen DHEA und einigen seiner Sulfokonjugate werden Angriffspunkte am Schlüsselenzym des Pentosephosphatzyklus, der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, beschrieben, die somit schon auf einer relativ frühen Stufe des Nucleinsäurestoffwechsels zu finden sind; der Bereitstellung von Ribosen.
Aus den Untersuchungen geht hervor, daß sowohl freie als auch die sulfokonjugierten Steroide einem Metabolismus, auch in der Gewebekultur unterliegen, von dessen Ausmaß die Wirkung der Androgene entscheidend abhängt. So kommt vor allem dem Quotienten DHEA/ADIOL (= Dehydroepiandrosteron/Androstendiol) große Bedeutung zu, der nach Inkubation der Primärkulturen in den Kulturen mit neoplastischem Gewebe, in denen kein Einfluß auf das Wachstum beobachtet wurde, niedriger war als in Kulturen mit normalem Gewebe. Mit zunehmender Wirksamkeit auf malignes Gewebe war auch eine Verschiebung des Quotienten zu höheren Werten zu beobachten, woraus abgeleitet werden kann, daß die Wirksamkeit des Hormons entscheidend vom Anteil des nicht hydrolysierten Anteils der Steroide abhängt, der wiederum offensichtlich sehr stark vom entsprechenden Gewebe beeinflußt wird. Die Hormone unterliegen also auch in der

Gewebekultur einem sehr differenzierten Stoffwechsel, was für die individuelle Resistenzentwicklung von Bedeutung sein dürfte und berücksichtigt werden sollte. Nach Betrachtung und Interpretation der morphologischen und biochemischen Ergebnisse, erhöhen sich die einleitend angegebenen 25 % Übereinstimmungen auf 100 %.

Das morphologische Bild einer mit Chemotherapeutika inkubierten Gewebekultur ist nur Ausdruck und Endresultat eines Spektrums funktioneller Störungen des Zellstoffwechsels. Die Messung des Einbaus radioaktiv markierter Nucleinsäurevorläufer ist eine von vielen Möglichkeiten, einen Einblick in die physiologisch-chemischen Vorgänge innerhalb einer Zelle zu gewinnen. Es werden damit sehr differenzierte Aussagen über die individuelle Resistenzlage möglich, was besonders für die Chemotherapie in der Klinik notwendig ist, weil die Malignome trotz gleicher Histologie eben eine sehr individuelle Reaktion zeigen.
Somit stellen diese Methoden eine nicht unbedeutende Bereicherung des herkömmlichen Krebs-Chemotherapie-Resistenztestes dar, zumal sie neben den qualitativen Aussagen - sensibel oder resistent - auch quantitative Aussagen über die Beeinflussung des Zellstoffwechsels, folglich auch über die individuelle Resistenzlage erlauben.

VI. ZUSAMMENFASSUNG:

In der vorliegenden Arbeit wurde über die Resistenztestung von Primärkulturen verschiedener gynäkologischer Tumoren berichtet.
Für die morphologische Beurteilung wurden folgende Substanzen verwendet:

- Androgene: DHEA-LS
  EME
- Gestagene: Hydroxynorporgesteroncapronat
  Norgestrel
- Zytostatika (Tab. 1, Tab. 2).

Für die radiochemischen Untersuchungen wurden nur die Androgene und Gestagene verwandt und ihre Wirkung anhand H^3-markierten Thymidins in die Zelle beurteilt.
Mit einer weiteren Methode wurden obengenannte Hormone und zusätzlich DHEA untersucht und die Wirkung anhand des H^3-Thymidineinbaus in die DNS bestimmt.

Zusammenfassend kann folgendes gesagt werden:

1. Die radiochemischen Untersuchungen mit Hilfe des Flüssigkeitsszintillationsspektrometers erlauben differenziertere Aussagen über die Resistenzlage der Primärkultur bzw. über die Wirksamkeit der getesteten Substanz.

2. Anhand des H^3-Thymidineinbaus kann eine quantitative Aussage über die Wirkung der Hormone gemacht werden.

3. Das individuelle Verhalten trat bei den radiochemischen Untersuchungen wesentlich ausgeprägter in Erscheinung als bei der morphologischen Beurteilung.

4. Die Messung des Einbaus markierter Nucleinsäurevorläufer in die DNS ist sowohl aufgrund zeitlicher Gesichtspunkte als auch qualitativ differenzierter Aussagemöglichkeiten besonders für die Routine-Resistenztestung geeignet.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. BAUER, K.H.: Das Krebsproblem. 2. Aufl. Springer-Verlag Berlin, 1963.

2. BRACHETTI, A.K.J.: Proliferationskinetik von Tumorzellen und ihre Beeinflussung durch Zytostatika. Med. Diss. Homburg/Saar, 1970.

3. DULBECCO, R., VOGT, M.: Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. J. exp. Med. 99: 167-182 (1954).

4. FRIEDRICH-FRESKA, H.: in: BAUER, K.H. Das Krebsproblem. 2. Aufl. Springer-Verlag Berlin, 1963.

5. FROWEIN, J.: Wirkungsweise von Hormonen aus molekular-biologischer Sicht. Dtsch. med. Wschr. 49: 1918-1922 (1972).

6. GENTRY, G.A. MORSE, P.A. POTTER, R. van: III. Relationship of thymidine to the metabolism of other pyrimidine nucleosides in suspension cultures derived from Novikoff Hepatoma. Cancer Res. 25: 517-524 (1965).

7. HARBERS, E.: Nucleinsäuren. 1. Aufl. G. Thieme-Verlag Stuttgart, 1969.

8. HECKMANN, U.: Zur Wirkung des Norhydroxyprogesteroncapronat auf das Adenocarcinoma corporis uteri in der Gewebekultur. Dtsch. med. Wschr. 90: 2328-2330 (1965).

9. HELLNER, H. NISSEN, R. VOSSCHULTE, K.: Lehrbuch der Chirurgie. 6. Aufl. G. Thieme-Verlag Stuttgart, 1970.

10. KARLSON, P.: Biochemische Wirkungsweise der Hormone.
Dtsch. med. Wschr. 86: 668-674 (1961).

11. KLEY, H.K.: Androgene.
Med. Klin. 68: 295-305 (1973).

12. KRAHE, M.: Verhalten von benignen und malignen Zellen des weiblichen Genitales in der Gewebekultur.
Med. Habil. Homburg/Saar, 1963.

13. KUMMER, D.: Cytostatica- und Röntgenstrahleneffekte im Nucleinsäurestoffwechsel von soliden, malignen Tumoren in vitro.
Z. Krebsforsch. 74: 76-90 (1970).

14. KUMMER, D.: Cytostatica-Sensibilitätstest solider, maligner Tumoren in vitro zur gezielten kombinierten operativen und chemotherapeutischen Behandlung des Krebsleidens.
Z. Krebsforsch. 76: 124-139 (1971).

15. LIMBURG, H., KRAHE, M.: Die Züchtung von menschlichem Krebsgewebe in der Gewebekultur und seine Sensibilitätstestung gegen neuere Cytostatika.
Dtsch. med. Wschr. 89: 1938-1946 (1964).

16. MANS, R.J., NOVELLI, G.D.: Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into protein by a filterpaper disk method.
Arch. Biochem. Biophys. 94: 48-53 (1961).

17. MARKS, F.: Chalone auf dem Weg in die Klinik.
Ärztl. Praxis 91: 4145 (1973).

18. MATTERN, J., VOLM, M., WAYSS, K.: Untersuchungen am soliden Walker-Karzinosarkom 256 der Ratte unter Einwirkung von Zytostatika. Arzneim.-Forsch. 22: 1721-1722 (1972).

19. NORDQUIST, S.: The Synthesis of DNA and RNA in normal human endometrium in short-term incubation in vitro and its response to oestradiol and progesterone. J. Endocr. 48: 17-28 (1970).

20. PSCHYREMBEL, W.: Klinisches Wörterbuch. 185-250. Aufl., W. de Gruyter Berlin, 1969.

21. RABES, H., JANTSCH, B.: Kombination von Kurzinkubation und Langzeitkultur beim Cytostatika-Test menschlicher Tumorzellen. Z. Krebsforsch. 74: 295-303 (1970).

22. RINDT, W., OERTEL, G.W., BRACHETTI, A.K.J., HOLZMANN, H., MORSCHES, B.: Metabolism of free DHEA and certain sulfoconjugates in cell cultures from neoplastic and normal human tissue. Steroids Lipids Res. 3: 345-352 (1972).

23. SEIDEL, H.J., WEGNER, L.A.: Zur Sensibilitätsbestimmung von Tumoren in vitro. Z. Krebsforsch. 72: 105-118 (1969).

24. SCHMÄHL, D.: Entstehung, Wachstum und Chemotherapie maligner Tumoren. 2. Aufl. Editio Cantor Aulendorf, 1970.

25. SCHOLTES, G.: Das Korpus- oder Endometriumkarzinom. Med. Klin. 68: 84-90 (1973).

26. SÜSS, R., VOLM, M.: Rapid Screening of macromolecular synthesis in singel cell cultures. Die Naturwissenschaften 55: 134-135 (1968).

27. SÜSS, R., KINZEL, V., SCRIBNER, J.D.: Krebs, Experimente und Denkmodelle. 1. Aufl. Springer-Verl. Berlin, 1970.

28. TANNEBERGER, S.: Gewebekultur und Krebschemotherapie. Arch. Geschwulstforsch. 31: 387-400 (1968).

29. TAUSK, M.: Pharmakologie der Hormone. 1. Aufl. G. Thieme-Verl. Stuttgart, 1970.

30. TRACERLAB: Flüssigszintillations-Meßtechniken. ICN Tracerlab Köln.

31. UFER, J.: Hormontherapie in der Frauenheilkunde 4. Aufl. W. de Gruyter Berlin, 1972.

32. VOLM, M., KAUFMANN, K.: Schnellmethode zur Sensibilitätstestung maligner Tumoren gegenüber Cytostatika. Klin. Wschr. 48: 374-376 (1970).

33. VOLM, M., SÜSS, R.: Einbau von ^{3}H-Thymidin, ^{3}H-Uridin und ^{3}H-Leucin in Tetrahymena, L-Zellen und Leber-Explantate unter Einfluß von carcinogenen Nitrosaminen und Nitrosamiden. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. u. exp. Path. 261: 353-359 (1968).

34. WERTH, G.: Zur Organisation und chemischen Leistung der Zelle. Med. Welt 20: 946-955 (1969).

35. WOLBERG, W.H.: The effect of 5-FU on DNA-thymine synthesis in human tumors. Cancer Res. 29: 2137-2143 (1969).

36. WÜST, G.: Selektive Chemotherapie menschlicher Tumoren: Methoden und klinische Erfahrungen. Med. Welt 50: 3035-3042 (1967).

37. ZOLLINGER, H.U.: Pathologische Anatomie Band I. 3. Aufl. G. Thieme-Verl. Stuttgart, 1971.

Für die Überlassung eines Arbeitsplatzes an seiner Klinik danke ich Herrn Prof. Dr. med. H. Limburg.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. W. Rindt für die freundliche Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Abfassung der Arbeit.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. med. A. Brachetti, sowie seinen Mitarbeitern im Gewebezuchtlabor für die Mithilfe bei der Ausführung der Arbeit danken.

Herrn Dr. med. M. Volm vom Deutschen Krebsforschungsinstitut in Heidelberg möchte ich für seine wertvollen Ratschläge danken.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. K. Kanig, der es mir ermöglichte, in seinem Labor zu arbeiten.

Lebenslauf

Am 19.8.1948 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Walter Strubel und seiner Ehefrau Lore geb. Kiep in Haßloch/ Pfalz geboren.
Nach dem Besuch der Volksschulen in Mannheim-Feudenheim und Haßloch/Pfalz von 1955 - 1959 trat ich in das Staatliche Leibniz-Gymnasium in Neustadt/Weinstraße ein, wo ich im Juni 1967 das Abitur ablegte.
Von Oktober 1967 bis Oktober 1968 leistete ich 12 Monate meines Grundwehrdienstes bei der Luftwaffe der Bundeswehr ab.
Im Wintersemester 1968/69 begann ich das Studium der Medizin an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken.
Ende des Sommersemesters 1969 bestand ich den naturwissenschaftlichen Teil der ärztlichen Vorprüfung,
Ende des Wintersemesters 1970/71 die ärztliche Vorprüfung in Homburg/Saar.
Nach dem Wintersemester 1973/74 beabsichtige ich das Staatsexamen an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes abzulegen.